德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤黏液中免疫和抗氧化指标以及皮肤中抗菌肽基因表达的影响

（河南科技大学动物科技学院，洛阳 471003）

曾庆辉　刘　敏　姚玉红　丁翔飞　史丽莎　李晓凡　张春暖*

摘　要：本试验主要研究了德氏乳酸菌（*Lactobacillus delbrueckii*）对黄河鲤（*Cyprinus carpio* Huanghe var.）皮肤黏液中免疫和抗氧化指标以及皮肤中抗菌肽基因表达的影响。将初重为(15.0±0.5）　g 的 450 尾黄河鲤随机分为 5 组，每组 3 个重复，每个重复 30 尾。3 组试验鱼分别投喂含德氏乳酸菌 0（对照组）、1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7} 和 1×10^{8} CFU/g 的饲料，饲养 8 周后，采集皮肤黏液和皮肤，测定皮肤黏液中免疫和抗氧化指标以及皮肤中抗菌肽基因[肝表达抗菌肽 1(*Leap*-1)和肝表达抗菌肽 2（*Leap*-2）]的相对表达量。结果显示：1×10^{6} 和 1×10^{7} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中溶菌酶（LYZ）、碱性磷酸酶（AKP）、超氧化物歧化酶（SOD）活性及补体 3（C3）、补体 4（C4）含量均显著高于对照组（$P<0.05$），同时其皮肤黏液中丙二醛（MDA）含量显著低于对照组（$P<0.05$），而 1×10^{5} 和 1×10^{8} CFU/g 德氏乳酸菌组的上述指标与对照组差异不显著（$P>0.05$）。皮肤黏液中酸性磷酸酶（ACP）活性各组之间差异均不显著（$P>0.05$）。1×10^{6} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性显著高于对照组（$P<0.05$），1×10^{5}、1×10^{6} 和 1×10^{7} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中总抗氧化能力（T-AOC）显著高于对照组（$P<0.05$）。各试验组皮肤中抗菌肽基因 *Leap*-1 和 *Leap*-2 的相对表达量均显著高于对照组（$P<0.05$），其中以 1×10^{7} CFU/g 德氏乳酸菌组最高。结果表明，饲料中添加 1×10^{6}～1×10^{7} CFU/g 的德氏乳酸菌能够提高黄河鲤皮肤的免疫功能和抗氧化能力，并能上调抗菌肽基因的表达。

收稿日期：2018-01-05
基金项目：河南科技大学大学生研究训练计划（SRTP）项目（2017313）；河南科技大学博士科研启动金（13480074）
作者简介：曾庆辉（1995-），男，河南信阳人，从事水产动物营养与饲料研究。E-mail：13015579260@163.com
*通信作者：张春暖，讲师，E-mail：　zhangchunnuan12@163.com

关键词：德氏乳酸菌；黄河鲤；皮肤；免疫；抗氧化

中图分类号：S963　文献标识码：A　文章编号：

鱼类是比较低等的脊椎动物，免疫系统远不如哺乳动物及禽类完善，其免疫系统可分为体外免疫系统及体内免疫系统，皮肤是鱼类体外免疫系统的重要组成部分，鱼类皮肤上含有大量的黏液细胞、巨噬细胞和各类淋巴细胞以及其他活性物质，在鱼体表面形成了阻挡病原微生物的保护膜，是抵御病原微生物感染的有效防线[1]。鱼类皮肤黏液成分比较复杂，研究发现鱼类皮肤黏液中不仅存在免疫球蛋白[2]，而且还含有多种酶和免疫因子，包括溶菌酶、组织蛋白酶、酯酶、金属蛋白酶、凝集素、干扰素、钙调素、补体、抗菌肽、组蛋白和核糖体蛋白等[3]。近年来，鱼类皮肤黏膜免疫应答的分子机制是鱼类免疫学研究热点问题之一，研究鱼类皮肤免疫相关基因在机体免疫中的作用，有助于理解鱼类皮肤免疫应答的分子调控机制，为鱼类病害的预防和治疗提供科学参考。

乳酸菌具有增强动物机体免疫力、改善胃肠道菌群平衡、抗氧化、抗肿瘤、抗高血压和降低胆固醇含量等作用[4]。据报道，乳酸菌作为免疫增强剂能够增强巨噬细胞活性、促进动物免疫器官的发育、提高细胞的吞噬能力，并且少量的乳酸菌持续刺激能够诱导产生干扰素、促进细胞分裂、产生抗体及促进细胞免疫等，从而提高体液免疫和细胞免疫水平[5]。但是关于德氏乳酸菌在鱼类皮肤免疫和抗氧化功能方面的相关报道还不多，因此，本试验以黄河鲤作为研究对象，在饲料中添加不同水平的德氏乳酸菌进行饲喂，测定皮肤中相关免疫和抗氧化指标，为德氏乳酸菌在提高鱼类免疫上的应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

德氏乳酸菌购自瑞士的Fluka公司，活菌数为1.0×10^{10} CFU/g；黄河鲤购自洛阳市某养殖场，初始体重为（15.0±0.5）g，试验开始前驯化2周，驯化期间投喂鲤鱼商品饲料（购自洛

阳禾丰饲料公司），鲤鱼商品饲料粗蛋白质含量为33.6%，粗脂肪含量为6.62%，每天投喂3次。

1.2　试验饲料

以商品饲料作为基础饲料，基础饲料以鱼粉、豆粕、菜籽粕和棉籽粕为蛋白质源，豆油、鱼油为脂肪源，其组成及营养水平见表1。在基础饲料中分别添加1×10^5、1×10^6、1×10^7和1×10^8 CFU/g的德氏乳酸菌，配制4种试验饲料。将各种饲料原料充分粉碎后过60目筛，并逐级混合，然后把德氏乳酸菌加入适量的水，和饲料原料充分混合后用绞肉制粒机制成直径为2 mm的颗粒饲料，并在40 ℃下烘15 h，使饲料水分含量小于10%，保存在-4 ℃冰箱备用。

表1　基础饲料组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diets （air-dry basis）　%

原料 Ingredients	含量 Content
鱼粉 Fish meal	8.00
豆粕 Soybean meal	30.0
菜籽粕 Rapeseed meal	15.00
棉籽粕 Cottonseed meal	15.00
次粉 Wheat middling	19.30
麸皮 Wheat bran	5.0
磷酸二氢钙 $Ca(H_2PO_4)_2$	1.80
预混料 Premix	1.00
豆油 Soybean oil	3.50
膨润土 Bentonite	1.00
食盐 NaCl	0.4
合计 Total	100.00

营养水平 Nutrient levels	
粗蛋白质 CP	33.60
粗脂肪 EE	6.62
粗灰分 Ash	6.93

每千克预混料中含有Supplied the following per kg of premix：$CuSO_4·5H_2O$ 2.0 g，$FeSO_4·7H_2O$ 25 g，$ZnSO_4·7H_2O$ 22 g，$MnSO_4·4H_2O$ 7 g，Na_2SeO_3 0.04 g，KI 0.026 g，$COCl_2·6H_2O$ 0.1 g，VA 900 000 IU，VD 200 000 IU，VE 4 500 mg，VK 3 220 mg，VB_1 320 mg，VB_2 1 090 mg，VB_5 2 000 mg，VB_6 500 mg，VB_{12} 1.6 mg，VC 10 000 mg，氯化胆碱 choline chloride 60 000 mg，泛酸 pantothenate 1 000 mg，叶酸 folic acid 165 mg。

1.3 饲养管理

驯化2周，选取450尾健康、规格一致的黄河鲤，随机分为5组，每组3个重复，每个重复30尾鱼。对照组投喂基础饲料，试验组投喂德氏乳酸菌添加量分别为$1×10^5$、$1×10^6$、$1×10^7$、$1×10^8$ CFU/g的试验饲料，养殖期为8周。每天投喂3次，投喂时间分别为07:00、12:00、17:00，每日的投喂量为鱼体重的4%～5%，并根据实际采食量相应的增加或减少，养殖期间水温控制在（25.0±0.2）℃，溶解氧浓度在（6.0±0.2）mg/L，pH 7.2±0.2，总氨氮浓度小于0.2 mg/mL。

1.4 样品采集与指标测定

1.4.1 样品采集

养殖试验结束后，试验鱼停食24 h，然后用MS-222(浓度为100 mg/L)对鱼进行麻醉，用干净玻片轻轻刮取皮肤黏液，收集5 mL，放入-20 ℃冰箱以备用，然后取其皮肤，将皮肤置于液态氮中冷冻1 h，然后储存在-80 ℃冰箱中，以备后续分析。

1.4.2 皮肤黏液中免疫和抗氧化指标的测定

皮肤黏液中溶菌酶（LYZ）、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）、过氧化氢酶(CAT)活性，补体3(C3)、补体4(C4)、丙

二醛(MDA)含量及总抗氧化能力（T-AOC）均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定，具体操作步骤详见说明书。

1.4.3　皮肤中抗菌肽基因相对表达量的测定

取皮肤组织0.1 g左右，参照Trizol使用说明书，提取总RNA，然后测定其浓度和质量，一般OD_{260}/OD_{280}在1.8～2.0之间表示质量较好，最后稀释成相同的浓度，进行cDNA的反转。参照大连宝生物公司提供的试剂盒说明书进行cDNA的反转，反应程序：第1步，42 ℃反应40 min；第2步，90 ℃反应2 min；最后4 ℃保存。之后10倍稀释，以备实时荧光定量PCR用。用Primer5软件设计引物，由上海英捷公司合成，引物序列见表2。按照SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa公司)使用说明进行实时荧光定量PCR，反应条件：94 ℃ 5 min→45个循环（每个循环中94 ℃变性30 s，55.9 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s）→72 ℃延伸7 min。选用β-激动蛋白（β-actin）作为内参基因，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因肝表达抗菌肽1(*Leap*-1)和肝表达抗菌肽2（*Leap*-2）的相对表达量。

表2　引物信息

Table 2　Primer information

基因 Genes	引物序列 Primer sequence (5´-3´)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
肝表达抗菌肽 1	F：CAGTACATCGTCTCTGTCGTC	KC551971.1
Leap-1	R：CAGTAGGCGCCATGAGGTTT	
肝表达抗菌肽 2	F：ACAGTACATCGTCTCTGTCGTC	XM_019099090.1
Leap-2	R：CGAGAAGAGCCCGTTTGTGA	
β-激动蛋白	F：TTTGGCGCTTGACTCAGGAT	M24113.1
β-actin	R：AGGCCATAAGGGAAGGGACA	

1.5　数据统计与分析

原始数据先用 Excel 2010 做简单的处理，再用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析，当各组差异显著时，用 Duncan 氏法进行均值间的多重比较，数据用平均值±标准误来表示，P<0.05 表示显著差异。

2 结果与分析

2.1 德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤黏液中免疫指标的影响

由表 3 可知，与对照组相比，添加德氏乳酸菌的各试验组皮肤黏液中各免疫指标均有不同程度的升高，其中 $1×10^6$ 和 $1×10^7$ CFU/g 德氏乳酸菌组的 LYZ、AKP 活性和 C3、C4 含量显著高于对照组（P<0.05），而 $1×10^5$ 和 $1×10^8$ CFU/g 乳酸菌组的这些指标与对照组差异不显著（P>0.05）。皮肤黏液中 ACP 活性各组之间差异均不显著（P>0.05）。

表3 德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤黏液中免疫指标的影响

Table 3 Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on skin mucous immune indexes of *Cyprinus carpio* Huanghe var.

德氏乳酸菌添加量 *Lactobacillus delbrueckii* addition (CFU/g)	溶菌酶 LYZ (U/mL)	酸性磷酸酶 ACP /(U/mL)	碱性磷酸酶 AKP /(U/mL)	补体 3 C3 /(mg/mL)	补体 4 C4 /(mg/mL)
0	$65.79±3.33^{c}$	12.02±0.25	$15.70±0.21^{b}$	$12.95±0.93^{b}$	$19.85±0.89^{b}$
$1×10^5$	$75.10±3.59^{bc}$	13.13±0.24	$16.79±0.28^{ab}$	$13.33±0.26^{b}$	$21.57±0.86^{ab}$
$1×10^6$	$89.66±2.67^{a}$	13.52±0.70	$18.22±1.06^{a}$	$16.21±0.47^{a}$	$22.96±0.55^{a}$
$1×10^7$	$80.57±2.16^{ab}$	12.66±0.04	$16.354±0.40^{b}$	$15.69±0.44^{a}$	$22.42±0.48^{a}$
$1×10^8$	$70.72±3.46^{bc}$	12.42±0.33	$15.94±0.04^{b}$	$13.53±0.48^{b}$	$21.54±0.62^{ab}$

同列数据肩标不同字母表示显著差异（P<0.05）。下表同。

Values in the same column with different letter superscripts were significantly different（P<0.05）. The same as below.

2.2　德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤黏液中抗氧化指标的影响

由表 4 可知，1×10^{6} 和 1×10^{7} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中 SOD 活性显著高于对照组（P<0.05），而其他各组之间差异不显著（P>0.05）；1×10^{6} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中 CAT 和 GPx 活性显著高于对照组（P<0.05），其他试验组与对照组并无显著差异（P>0.05）；1×10^{5}、1×10^{6} 和 1×10^{7} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中 T-AOC 显著高于对照组（P<0.05），其他试验组与对照组无差异不显著（P>0.05）；在 1×10^{6} 和 1×10^{7} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中 MDA 含量显著低于对照组（P<0.05），而其他试验组与对照组无差异不显著（P>0.05）。

表4　德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤粘液中抗氧化指标的影响

Table 4　Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on skin mucous antioxidant indexes of *Cyprinus carpio* Huanghe var.

德氏乳酸菌添加量 *Lactobacillus delbrueckii* addition (CFU/g)	超氧化物歧化酶 SOD/ (U/mL)	过氧化氢酶 CAT/ (U/mL)	谷胱甘肽过氧化物酶 GPx/ (U/mL)	总抗氧化能力 T-AOC/ (U/mL)	丙二醛 MDA/ (nmol/mL)
0	22.55±0.54^{a}	14.70±0.71^{ab}	13.71±0.57^{b}	6.45±0.28^{c}	5.12±0.51^{a}
1×10^{5}	23.65±0.39^{a}	15.55±0.71^{bc}	15.29±0.85^{b}	7.61±0.32^{ab}	4.15±0.29^{ab}
1×10^{6}	28.62±1.25^{b}	17.12±0.48^{c}	18.87±0.59^{a}	8.08±0.41^{a}	3.45±0.10^{b}
1×10^{7}	26.59±0.90^{b}	14.99±0.43^{ab}	14.54±0.47^{b}	7.50±0.02^{ab}	3.70±0.31^{b}

1×10[8]	22.76±0.31[a]	13.40±0.66[a]	15.41±0.65[b]	6.68±0.29[bc]	4.88±0.31[a]

2.3　德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤中基因表达的影响

由图 1 可知，各试验组皮肤中抗菌肽基因 *Leap*-1 和 *Lea*p-2 的相对表达量均显著高于对照组（*P*<0.05），且在 1×10[7] CFU/g 德氏乳酸菌组达到最高。

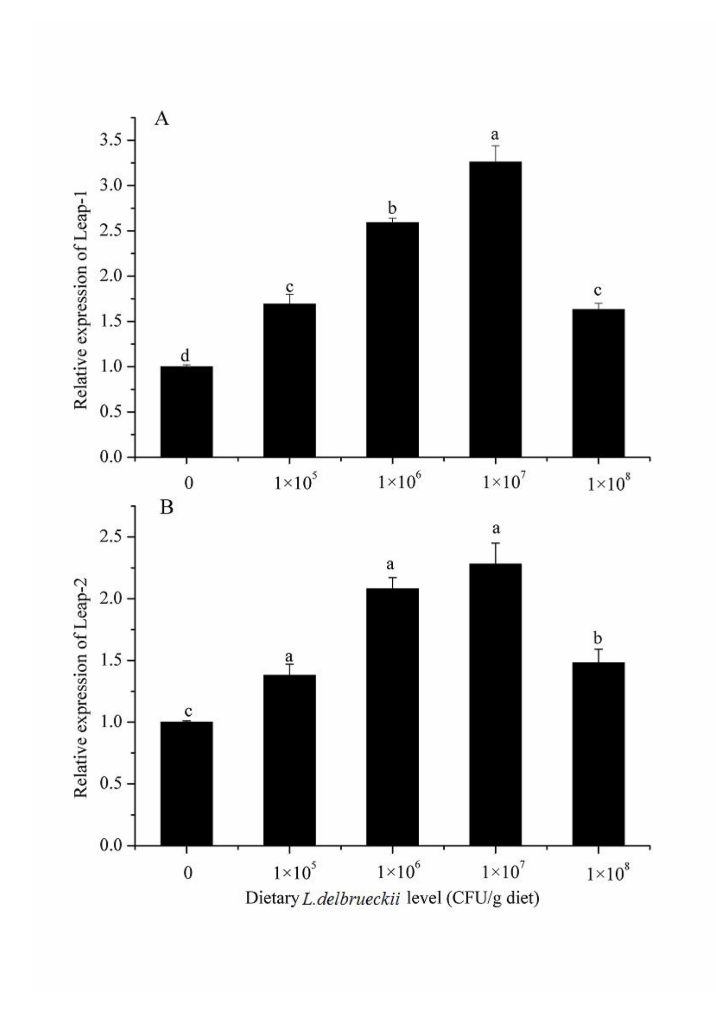


图1　德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤中*Lea*p-1（A）和*Leap*-2相对表达量（B）的影响

Fig.1　Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on relative expression levels of *Leap*-1 (A) and (B) *Leap*-2 genes in skin of *Cyprinus carpio* Huanghe var.

3　讨　论

3.1　德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤黏液中免疫指标的影响

鱼类的皮肤中含有大量的黏液细胞、巨噬细胞和抗体分泌细胞，与其他活性物质组成了

抵御病原微生物感染的有效防线[6]。本研究结果显示，饲料中添加不同水平的德氏乳酸菌后，黄河鲤皮肤黏液中 LYZ、ACP 活性和 C3 和 C4 含量随升高程度不同，但均有升高，这证明黄河鲤的免疫功能有所提高。溶菌酶是机体内重要的免疫因子之一，主要由一些免疫细胞分泌产生，鱼类的皮肤黏液中含有多种酶和免疫因子，这些物质对鱼类免疫反应起到重要作用。乳酸菌作为一种益生菌，能够促进有益菌的增殖并抑制有害菌的增殖，一些有益菌比如乳酸菌和双歧杆菌的细胞壁含有脂磷壁酸(LTA)和肽聚糖、磷壁酸复合物，它们具有很强的免疫佐剂活性作用，能够提高鱼类的免疫力[7]。潘康成等[8]报道，乳酸菌可提高水产动物免疫识别力，诱导 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞产生细胞因子，通过淋巴细胞再循环而活化全身免疫系统，从而增强机体的非特异性和特异性免疫功能。关于益生菌提高鱼类血液 LYZ 活性的已有相关的报道[9-10]，另外皮肤中的补体在鱼类皮肤免疫应答过程中也发挥着重要作用[11]，其中 C3、C4 在鱼体抵抗病原入侵中发挥着重要作用，C3 是所有补体激活途径的关键因子[12-13]。关于乳酸菌提高 C3、C4 含量在黄河鲤的血液上有相关的研究，但是在皮肤上的研究还未见报道，C3、C4 能够增强免疫功能可能与其激活相关免疫通路的关键位点的关键基因有关，具体的分子机制还有待进一步研究。

3.2 德氏乳酸菌对黄河鲤皮肤黏液中抗氧化指标的影响

SOD 和 CAT 是主要的抗氧化酶，SOD 负责把 O_2^{-}•转化成氧气（O_2）和过氧化氢（H_2O_2），CAT 能够把 H_2O_2 分解成 O_2 和水（H_2O）[14]，以清除机体内过多的自由基。T-AOC 是一项能够反映机体总抗氧化功能的综合性指标。本研究结果得出，黄河鲤皮肤黏液抗氧化指标中的 SOD、CAT、GPx 活性及 T-AOC 随着德氏乳酸菌添加量的增加而呈先增加后降低的趋势，其中 1×10^{6} CFU/g 德氏乳酸菌组皮肤黏液中 SOD、CAT、GPx 活性最高。德氏乳酸菌的抗氧化功能可能与它的益菌保护作用有关，早期的试验证明乳酸菌的代谢产物具有抗氧化功能[15-17]，另外，乳酸菌也可能作为调节肠道微生物平衡的物质促进机体的抗氧化功能，已有研究报道乳酸菌素提高了肉鸡的抗氧化功能[16]。本试验结果表明饲料中添加适量的德氏乳酸菌

能在一定程度上提高黄河鲤的抗氧化能力。

3.3 德氏乳酸菌对黄河鲤的皮肤中抗菌肽基因表达的影响

抗菌肽基因广泛存在于鱼类中，是鱼类先天免疫系统的重要组成部分，在抵御病原微生物入侵的过程中发挥着重要作用[18]。本试验中，添加德氏乳酸菌的各试验组黄河鲤皮肤中抗菌肽基因 *Leap*-1 和 *Lea*p-2 的相对表达量均较对照组显著升高，这表明添加德氏乳酸菌提高了黄河鲤的免疫力和抗病力，这可能是由于德氏乳酸菌提高了皮肤黏液中免疫酶的活性，免疫酶在机体的免疫应答反应中起到了重要作用；另外，免疫球蛋白和一些细胞因子可以作为调节免疫的重要因素，并且乳酸菌产生的一些短链脂肪酸可以促进肠道内有益菌比如乳酸菌的增殖，抑制有害菌生长，这与免疫反应的调节都密切相关。关于乳酸菌提高鱼类免疫的研究有相似的报道[19-20]，该研究还得出过高浓度的德氏乳酸菌并不能起到较好的效果，因此，适宜的添加量对德氏乳酸菌的作用效果有直接的影响。

4 结 论

饲料中添加适量的德氏乳酸菌能够提高黄河鲤皮肤的免疫功能和抗氧化能力，并能上调抗菌肽基因的表达。在本试验条件下，黄河鲤饲料中德氏乳酸菌的最适添加量为 1×10^6～1×10^7 CFU/g。

参考文献：

[1] ESTEBAN M Á.An overview of the immunological defenses in fish skin[J].ISRN Immunology,2012,2012:853470.

[2] SALINAS I,ZHANG Y A,SUNYER J O.Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish[J].Developmental & Comparative Immunology,2011,35(12):1346–1365.

[3] XU D H,KLESIUS P H.Protective effect of cutaneous antibody produced by channel catfish,*Ictalurus punctatus* (Rafinesque),immune to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet on cohabited non-immune catfish[J].Journal of Fish Diseases,2003,26(5):287–291.

[4] 湛剑龙,胡萍,陈韵,等.功能性乳酸菌的应用研究[J].食品安全质量检测学报,2014,5(4):1002–1009.

[5] 吴妍妍,张文举,胡猛,等.乳酸菌在动物生产中应用的研究进展[J].中国畜牧兽医,2013,40(2):221–224.

[6] ZHAO X G,FINDLY R C,DICKERSON H W.Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish[J].Developmental & Comparative Immunology,2008,32(5):500–508.

[7] HIMANEN J P,SARVAS M,HELANDER I M.Assessment of non-protein impurities in potential vaccine proteins produced by *Bacillus subtilis*[J].Vaccine,1993,11(9):970–973.

[8] 潘康成,杨汉博.饲用芽孢菌作用机理的研究进展[J].饲料工业,1997(9):32–34.

[9] 赵晶晶，秦操，董惠峰,等.益生菌对点带石斑鱼非特异性免疫功能的影响[J].动物医学进展,2013(5):26-30.

[10] MÖCK A,PETERS G.Lysozyme activity in rainbow trout,*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum),stressed by handling,transport and water pollution[J].Journal of Fish Biology,2010,37(6):873–885.

[11] 吕爱军,胡秀彩,孙敬锋,等.鱼类皮肤免疫应答及蛋白质组学[J].水产科学,2016,35(3):302–307.

[12] 王志平,张士璀,王光锋.鱼类补体系统成分及补体特异性和功能的研究进展[J].水生生物学报,2008,32(5):760–769.

[13] WOEHL J L,STAPELS D A C,GARCIA B L,et al.The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits the classical and lectin pathways of complement by blocking formation of the C3 proconvertase[J].Journal of Immunology,2014,193(12):6161–6171.

[14] JOVANOVIĆ-GALOVIĆ A,BLAGOJEVIĆ D P,GRUBOR-LAJŠIĆ G,et al.Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia*

nubilalis,Hubn.):diapause and metamorphosis[J].Archives of Insect Biochemistry and Physiology,2004,55(2):79–89.

[15] LIN M Y,YEN C L.Antioxidative ability of lactic acid bacteria[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,1999,47(4):1460–1466.

[16] 林湜.乳酸菌素对肉鸡生产性能影响及作用机理的研究[D].硕士学位论文.福建农林大学,2011.

[17] YAGI R,DOI M.Isolation of an antioxidative substance produced by *Aspergillus repens*[J].Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry,1999,63(3):932–933.

[18] 梁涛.团头鲂两种肝脏表达抗菌肽和β防御素基因的克隆与表达研究[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2013.

[19] LIN H L,SHIUH Y L,CHIU C S,et al.Screening probiotic candidates for a mixture of probiotics to enhance the growth performance,immunity,and disease resistance of Asian seabass,*Lates calcarifer* (Bloch),against *Aeromonas hydrophila*[J].Fish & Shellfish Immunology,2017,60:474–482.

[20] MIANDARE H K,YARAHMADI P,ABBASIAN M.Immune related transcriptional responses and performance of *Litopenaeus vannamei* post-larvae fed on dietary probiotic *PrimaLac*®[J].Fish & Shellfish Immunology,2016,55:671–678.

Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on Immune and Antioxidant Indexes in Skin Mucous and Antibacterial Peptide Gene Expression in Skin of *Cyprinus carpio* Huanghe var.

(*College of Animal Science and Technology*, *Henan University of Scientific and Technology,*

*Corresponding author, lecturer, E-mail： zhangchunnuan12@163.com (责任编辑 菅景颖)

Luoyang 471003, *China*)

ZENG Qinghui LIU Min YAO Hongyu DING Xiangfei SHI Lisha LI Xiaofan ZHANG Chunnuan*

Abstract: The aim of the present study was to investigate the effects of *Lactobacillus delbrueckii* (*L. delbrueckii*) on the immune and antioxidant indexes in skin mucous and the antimicrobial peptide gene expression in skin of *Cyprinus carpio* Huanghe var. A total of 450 *Cyprinus carpio* Huanghe var. with the initial body weight of (15.0±0.5) g were randomly distributed into five groups with three replicates per group and 30 fish per replicate. The fish in those three groups fed diets containing 0 (control group), 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7 and 1×10^8 CFU/g *L. delbrueckii,* respectively, for 8 weeks. At the end of feeding trail, the skin mucous and skin were collected, and the immune and antioxidant indexes in the skin mucous and the relative expression levels of antimicrobial peptide genes including liver-expressed antimicrobial peptide-1 (*Leap*-1) and liver-expressed antimicrobial peptide-2 (*Leap*-2) in the skin were determined. The results showed that the activities of lysozyme (LYZ), alkaline phosphatase (AKP), superoxide dismutase (SOD) and the contents of complement 3 (C3) and complement 4 (C4) in skin mucous of the 1×10^6 and 1×10^7 CFU/g *L. delbrueckii* groups were significantly higher than those of the control group (P<0.05), while the malondialdehyde (MDA) content in skin mucous of the 1×10^6 and 1×10^7 CFU/g *L. delbrueckii* groups was significantly lower than that of the control group (P<0.05). There were no significant differences of above parameters between the 1×10^5 or 1×10^8 CFU/g *L. delbrueckii* groups and the control group (P>0.05). No significant difference was found in the acid phosphatase (ACP) activity in skin mucous among groups （P>0.05）. The activities of catalase (CAT) and glutathion peroxidase (GPx) in skin mucous of the 1×10^6 CFU/g *L. delbrueckii* group were significantly higher than those of the control group (P<0.05), and the total antioxidant

capacity (T-AOC) in skin mucous of the 1×10^5, 1×10^6 and 1×10^7 CFU/g CFU/g *L. delbrueckii* groups was significantly higher than that of the control group (P<0.05). In addition, the relative expression levels of antimicrobial peptide genes *Leap*-1 and *Leap*-2 in skin of all experimental groups were significantly up-regulated compared with the control group (P<0.05), and highest values were all found in the 1×10^7 CFU/g *L. delbrueckii* group. Those results demonstrate that diet supplemented with 1×10^6 to 1×10^7 CFU/g *L. delbrueckii* can enhance the immunity, antioxidant capability and *Leap*-1 and *Leap*-2 gene expression in skin of *Cyprinus carpio* Huanghe var.

Key words: *Lactobacillus delbrueckii*; *Cyprinus carpio* Huanghe var.; skin; immune; antioxidant